

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 197 35 994 A 1**

(51) Int. Cl. 6:

C 12 N 15/70

C 12 N 15/74

C 12 N 15/80

C 12 N 9/90

C 12 N 9/88

C 12 N 9/12

C 12 P 19/32

C 12 P 19/18

(21) Aktenzeichen: 197 35 994.9

(22) Anmeldetag: 19. 8. 97

(43) Offenlegungstag: 25. 2. 99

(71) Anmelder:

Piepersberg, Wolfgang, Prof. Dr., 42349 Wuppertal,
DE

(72) Erfinder:

Piepersberg, Wolfgang, 42349 Wuppertal, DE;
Distler, Jürgen, 42107 Wuppertal, DE; Albermann,
Christoph, 42369 Wuppertal, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

EP 03 80 470 B1

EP 05 06 262 A1

WO 97 37 682 A1

WO 96 40 971 A1

JP 5-276974 A, In: Patents Abstracts of Japan,
C-1159, Jan. 31, 1994, Vol. 18, No. 58;

Chemical Abstracts:

Vol. 127, Ref. 304631;

Vol. 127, Ref. 258343;

Vol. 126, Ref. 101534c;

Vol. 125, Ref. 319500q;

Vol. 124, Ref. 108060n;

Vol. 121, Ref. 153029h;

Vol. 119, Ref. 24394h;

Vol. 119, Ref. 7278f;

Vol. 117, Ref. 21239j;

Vol. 116, Ref. 190820b;

Vol. 114, Ref. 225461y;

Vol. 113, Ref. 189743k;

BIOSIS, 97:390317;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Verfahren zur enzymatischen Synthese von Guanosindiphosphat-6-desoxyhexosen und deren Verwendung
zur Herstellung von Oligosacchariden

(55) Die Mannose und ihre natürlichen Derivate sind wichtige Bestandteile in chemisch schwer oder gar nicht zugänglichen Zuckerverbindungen (Poly- und Oligosaccharide, Glykonjugate, Sekundärmetabolite), die von hoher medizinischem, biotechnischem oder sonstigem Nutzen sind. Hier wird ein Verfahren beschrieben für die Herstellung der GDP-D-Mannose und der daraus abgeleiteten Biosynthesebausteine, z. B. GDP-4-Keto-6-desoxymannose, GDP-L-Fucose und GDP-D-Perosamin, sowie der dazu benötigten Gene und Enzyme. Weitere Verfahren der Anwendung der GDP-D-Mannose und ihrer Derivate sowohl als Ausgangsmaterialien für enzymatische in vitro Synthesen als auch für die in vivo Synthese durch Übertragung auf geeignete Rezeptorsubstanzen mittels geeigneter Glycosyltransferasen, die ebenfalls gentechnisch hergestellt werden, werden ebenfalls beschrieben. Das letztere Verfahren wird sowohl in Biotransformationen, z. B. nach Fütterung einer Akzeptorsubstanz an den GDP-Hexose herstellenden rekombinanten Organismus, als auch in der biochemischen Kombinatorik (Biokombinatorik) in einem anderen rekombinanten Organismus, der eine geeignete Akzeptorsubstanz biosynthetisch herstellt, eingesetzt.

DE 197 35 994 A 1

DE 197 35 994 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen in vivo (d. h. in Mikroorganismenzellen) und in vitro Synthese von Guanosindiphosphat(GDP)-6-desoxyhexosen, beispielsweise GDP4-Keto-6-desoxy-D-mannose, 5 GDP-L-Fucose und GDP-L-Perosamin, ausgehend von einfachen Nährstoffen bzw. von GDP-D-Mannose. Das Verfahren betrifft weiterhin die Verwendung der in Mikroorganismen bzw. in situ gebildeten GDP-(6-Desoxy-)hexosen zur Synthese von Oligo- oder Polysacchariden mittels Glycosyltransferasen.

In der Natur in großer Menge auftretende einfache Hexosen, beispielsweise D-Glucose, D-Glucosamin, D-Mannose und D-Galactose, werden in Oligo- oder Polysaccharide eingebaut indem sie zunächst mittels Nucleosidtriphosphaten 10 (NTP) zu NDP-Hexosen (UDP-, dTDP-, GDP-, CDP-Hexosen) aktiviert werden und anschließend durch spezifische Glycosyltransferasen auf entsprechende Vorläuermoleküle übertragen werden. Vielfach werden aber diese einfachen Zucker zunächst noch biosynthetisch zu sekundär veränderten NDP-aktivierten Hexosederivaten umgesetzt. Eine große Gruppe dieser Zuckermoleküle, NDP-6-Desoxyhexosen (meist dTDP-, GDP-, oder CDP-aktivierte Hexosederivate), ist 15 durch den Verlust der 6-Hydroxylgruppe gekennzeichnet und wird in vielerlei Abwandlungen in viele biologische Moleküle mit charakteristischer Funktion eingebaut. Typische Vertreter dieser Stoffgruppe sind die L-Fucose (aus GDP-D-Mannose), die L-Rhamnose (aus dTDP-D-Glucose) und die 3,6-Didesoxyhexosen der Enterobakterien (z. B. D-Colitose; aus CDP-D-Glucose). Aus GDP-D-Mannose hergestellte Zuckerderivate, wie z. B. L-Fucose und D-Perosamin, werden 20 über Enzyme hergestellt, die vielfach Endprodukt-gehemmt sind. Ein großer Vorteil für die Überproduktion in einem Wirtsorganismus sind dabei Enzymtypen, die nur schwache oder keine Endproduktthemmung zeigen, wie z. B. die ManB (Phospomannomutase) und ManC (Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase [GDP-Mannose Pyrophosphorylase od. Synthase]) Enzyme aus dem gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* (Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P.R., J Bacteriol 178 (16), 4885-4893, 1996 Aug).

Der charakteristische Biosyntheseweg der 6-Desoxyhexosen startet mit einer Dehydratisierungsreaktion katalysiert durch eine NAD(+)-abhängige NDP-Hexose 4,6-Dehydratase, wodurch eine NDP-6-Desoxy-D-4-hexulose entsteht 25 (Fig. 1; Piepersberg, W., Crit. Rev. Biotechnol. 14, 251-285, 1994; Liu, H.-W. O Thorson, J.S., Ann. Rev. Microbiol. 48, 223-56, 1994; Piepersberg, W., Distler, J. In: Biotechnology (2nd Ed.), Vol. 7, Products of Secondary Metabolism (Rchm, H.-J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., Eds.), S. 397-488, 1997). Weitere Modifikationsreaktionen können sich auf der Stufe der D-Konfiguration abspielen und benützen beispielsweise die 4-Ketoverbindung entweder zur Transamierung, Dehydroxylierung der benachbarten 3-Hydroxygruppe über eine Dehydrasereaktion oder zur enantioselektiven 30 Reduktion zur 4-Hydroxygruppe. Andere Biosynthesewege wandeln die NDP-6-Desoxy-D-4-hexulose zunächst über eine Epimerasereaktion in eine NDP-6-Desoxy-L-4-hexulose um, wobei meist neben der Position 5 auch die Positionen 3 der Hexose gleichzeitig in ihrer Stereospezifität umgekehrt werden (Fig. 1).

Die direkte Herstellung von Fucose ausgehend von Mannose kann im Stoffwechsel nur in der Nukleotid-aktivierten Form erfolgen. Die biosynthetischen Enzyme sind daher auf eine Aktivierung, d. h. den Nukleotidteil, angewiesen. Die 35 Biosynthese anderer sekundärer, d. h. stark modifizierter Zucker erfolgt ebenfalls in der Nukleotid-aktivierten Form, wie andere und wir am Beispiel der dTDP-L-Rhamnose gezeigt haben (Dt. Patentanmeldung 195 37 217.4; Verseck, S., Dissertation, Universität Wuppertal, 1997). Dabei ist dTDP-6-Desoxy-D-Xylo-4-Hexulose ein Zwischenprodukt des Biosyntheseweges. Die enzymatische Synthese und Isolierung dieser Substanz wurde beschrieben (Marumo, K., Lindqvist, L., Verma, N., Weintraub, A., Reeves, P. R., Lindberg, A. A., Eur. J. Biochem. 204, 539-545, 1992).

Aus der GDP-D-Mannose wird beispielsweise die GDP-L-Fucose in zwei bis drei aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten hergestellt, wie von Chang et al. am Beispiel der Schweine-Speicheldrüsen erarbeitet wurde (J. Biol. Chem., 263, 1693-1697, 1988) und in Analogie zur Biosynthese der L-Rhamnose und der L-(Dihydio-)Streptose in Bakterien (Marumo, K., Lindqvist, L., Verma, N., Weintraub, A., Reeves, P. R., Lindberg, A. A., Eur. J. Biochem. 204, 539-545, 1992; Verseck, Dissertation, Wuppertal, 1997) vermutet wurde. Reeves et al. (Stevenson, G., Andrianopoulos, 40 K., Hobbs, M., Reeves, P.R., J. Bacteriol. 178, 4885-4893, 1996) vermuteten aufgrund der genetischen Hinweise in *Escherichia coli*, daß die beiden Gene gmd (GDP-D-Mannose 4,6-Dehydratase) und wcaG (vermutliche GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose 3,5-Epimerase/4-Ketoreduktase), im Gencluster für die Synthese der Colansäure ausreichen, um die Umsetzung zur GDP-L-Fucose zu bewerkstelligen. Folglich würden im Gegensatz zur Synthese von dTDP-L-Rhamnose aus dTDP-D-Glucose für die GDP-L-Fucose-Synthese aus GDP-D-Mannose nur zwei statt drei Enzyme benötigt (Marumo, K., Lindqvist, L., Verma, N., Weintraub, A., Reeves, P. R., Lindberg, A. A., Eur. J. Biochem. 204, 539-545, 1992; Verseck, S., Dissertation, Wuppertal, 1997). Chang et al. (J. Biol. Chem., 263, 1693-1697, 1988) beschrieben bereits die 45 Umwandlung von GDP-D-Mannose erst GDP4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose mittels einer spezifischen Dehydratase, anschließend mittels einer Epimerase- und Ketoreduktase-Aktivität zu GDP-L-Fucose. Von dem gemeinsamen Zwischenprodukt, GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose, leiten sich dann vermutlich auch andere Desoxyhexosen ab, wie z. B. das 50 Transaminierungsprodukt GDP-D-Perosamin, das von der Beteiligung des Gens rfbE in dem Enterobakterium *Vibrio cholerae* abhängen soll, die für eine mögliche Perosamin Synthase kodieren soll (Manning, P.A., Stroher, U.H., Karageorgos, L.E., Morona, R., Gene 158, 1-7, 1995). Die direkte Herstellung von L-Fucose, D-Perosamin und anderen Abkömmlingen des beschriebenen GDP-6-Desoxyhexose Biosyntheseweges ausgehend von der D-Mannose kann im Stoffwechsel ohne Anwesenheit der spezifischen Nukleotidgruppe jedenfalls nicht vollzogen werden.

L-Fucose und D-Perosamin sind wichtige Bausteine von extrazellulären Polysacchariden, von Glycoproteinen und anderer Zelloberflächen-Glycokonjugate, beispielsweise des Tetrasaccharids Sialyl LewisX, und für die jeweiligen Wirkstoffqualitäten wichtige Bestandteile anderen Naturstoffen, beispielsweise des Macrolid-Antibiotikums Perimycin. Die Übertragung des Zuckers aus den GDP-aktivierten Vorstufen in solche (pseudo-) saccharidischen Endprodukte erfolgt 55 über spezifische Glycosyltransferasen. Quellen für Fucosyltransferasen sind beispielsweise der Mensch, Fucosyltransferasen Fut1 (Flegel W. A., Universität Ulm, (im Druck), Fut2 (Kelly,R.J., Rouquier,S., Giorgi,D., Lennon,G.G., J.Biol.Chem. 270 (9), 4640-4649, 1995) oder Fut3 (Cameron,H.S., Szczepaniak,D. and Weston,B., J. Biol. Chem. 270 (34), 20112-20122, 1995), und verschiedene Bakterien, z. B. das *Escherichia coli* Genprodukt RffT (Stevenson,G., Hobbs, M., Andrianopoulos,K. and Reeves,P., J. Bacteriol. 178 (16), 4885-4893 (1996)), das *Yersinia enterocolitica*

Genprodukt WbcH (Zhang, L., Radziejewska-Lebrecht, J., Krajewska-Pietrasik, D., Toivanen, P., Skumik, M., Mol. Microbiol. 23, 63–76, 1997), oder das Genprodukt FucT aus Helicobacter pylori (Martin, S.L., Edbrooke, M.R., Van den Eijnden, D.H. Bird, M.I., Glycobiology (im Druck)).

Die Patentanmeldung beschreibt: (1) ein Verfahren zur Überproduktion der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose und der GDP-L-Fucose Biosynthetische Enzyme Phosphomannomutase ManB, GDP-D-Mannose Synthase ManC (Pyrophosphorylase, Mannose-1-Phosphat Guanyltransferase), GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase Gmd, und GDP4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-Epimerase/4-Ketoreduktase WcaG (GDP-L-Fucose Synthase) aus Escherichia coli (Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P.R., J. Bacteriol. 178, 4885–4893, 1996) in geeigneten Wirtsorganismen, beispielsweise Escherichia coli; (2) ein Verfahren zur präparative in vitro Gewinnung und Aufreinigung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose und der GDP-L-Fucose; (3) ein Verfahren zur Überproduktion der GDP-D-Perosamin Synthase RfbE (GDP4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 4-Aminotransferase) aus Vibrio cholerae O1 und dessen Nutzung zur präparativen Herstellung von GDP-D-Perosamin; (4) ein Verfahren zur in vitro und in vivo L-Fucosylierung und D-Perosaminylierung durch Glycosyltransfer auf geeignete Substrate und durch Bereitstellung optimierter Mengen des Substrats GDP-L-Fucose.

Die GDP-L-Fucose kann beispielsweise zur enzymatischen Synthese von Oligosacchariden, z. B. 2-Fucosyl-beta-Galactosiden oder 3-Fucosyl-beta-N-Acetylgalactosaminen, mittels geeigneter Fucosyltransferasen eingesetzt werden; das GDP-D-Perosamin kann ebenfalls zur Glycosylierung geeigneter Rezeptormoleküle wie Oligosaccharide oder Sekundärmetabolite (z. B. Makrolide wie das Perimycin) mittels geeigneter Glycosyltransferasen, z. B. die Perosaminyltransferase aus Vibrio cholerae O1 bzw. anderer gram negativer oder gram positiver Bakterien, verwendet werden.

Demnach betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur rekombinannten Herstellung von Enzymen zur Biosynthese und Übertragung (Glycosyltransferasen) von GDP-Hexosen, zur enzymatischen Herstellung von Guanosindiphosphat-D-Mannose, Guanosindiphosphat-6-desoxy-D-hexulosen (z. B. GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose), Guanosindiphosphat-6-desoxy-L-hexosen (z. B. GDP-L-Fucose) und Guanosindiphosphat-4,6-didesoxy-D-hexosamine (z. B. GDP-D-Perosamin). Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß durch das beschriebene Verfahren bisher nicht in größeren Mengen herstellbare GDP-aktivierte Zucker in präparativem Maßstab gewinnbar werden und daß darüberhinaus die gewonnenen Bausteine zur in vitro oder in vivo Synthese von wertvollen Wirkstoffen weiterverwendet werden können. Das Verfahren ist gekennzeichnet durch Isolierung von geeigneten Genen aus Bakterien und deren gentechnischen Einbau in neue Empfängerorganismen, bevorzugt unter Kontrolle geeigneter Kontrollelemente (z. B. Promotoren) zur stärkeren oder steuerbaren Expression der Produkte, oder in neue Stoffwechselbeziehungen mit anderen Genen, um so für die genannten Zwecke und Nutzungsmöglichkeiten verwertbar zu werden.

Beispiele

In folgenden wird das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung anhand von Beispielen näher beschrieben.

Beispiel 1

Anzucht von E. coli-Stämmen, Präparation der Plasmid-DNA und Isolierung von DNA-Fragmenten

E.coli DH5 α und E.coli BL21(DE3) wurden vorzugsweise in LB-Medium (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, Natriumchlorid 5 g/l) bei 37°C bebrütet. Plasmid-tragende Bakterien wurden unter Selektionsdruck von Antibiotika gehalten (Ampicillin 100 μ g/ml; Chloramphenicol 30 μ g/ml). Die Kultivierung erfolgte auf einem Rundschüttler bei 270 rpm. Als Übernachtkultur wurden Ansätze bezeichnet, die mindestens 12 h bebrütet wurden.

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden die Zellen aus einer 1,5 ml Übernachtkultur, unter Selektionsdruck bebrütet, eingesetzt. Die Isolierung der Plasmide erfolgte nach der Methode der alkalischen SDS-Lyse (Birnboim, H.C., Doly, J., Nucleic Acid Res. 7, 1513, 1979).

Zur Hydrolyse von Vektor-DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen nach Vorschrift des Herstellers (Gibco BRL, Eggenstein) eingesetzt. Zur Restriktion von 10 μ g Plasmid-DNA wurden 5 U (Unit) der jeweiligen Restriktionsendonuklease eingesetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Um eine vollständige Hydrolyse zu gewährleisten wurde die gleiche Menge Restriktionsendonuklease ein zweites Mal zugegeben und wiederum wenigstens für 1 h inkubiert.

Die gespalte DNA wurde mit Hilfe eines 1%igen horizontalen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Zur Elution wurde die Gelstücke, welche die DNA-Fragmente enthielten, mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA-Fragmente aus der Agarose erfolgte nach Vorschrift mit dem JETsorb-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen).

Beispiel 2

Isolierung von chromosomaler DNA (modifiziert, Pospiech, A., Neumann, B., TIG 11, 217–218, 1995)

Für E. coli DH5 α Zellen wurde eine 1,5 ml ÜN-Kultur bei 37°C in LB-Medium angezogen und durch Zentrifugation (5 min, 7000 rpm) geerntet. Das Zellsediment wurde in 567 μ l TE-Puffer resuspendiert und zusammen mit 30 μ l SDS (10%), 20 μ l Lysozym-Lösung (20 mg/ml) und 3 μ l Proteinase K (20 mg/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100 μ l 5 M Natriumchlorid-Lösung und 80 μ l CTAB-Lösung (Hexadecyltrimethylammonium-bromid) zugegeben und mehrfach invertiert und bei 65°C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 800 μ l Chloroform/Isoamylalkohol wurde 5 min zentrifugiert (3000 rpm) und die wässrige Phase in einem neuen Gefäß mit dem selben Volumen Phenol/Chloroform vermischt. Durch Zentrifugation wurden die Phasen erneut getrennt und die wässrige Phase mit 0,6 Volumenteilen 2-Propanol zusammengegeben und die gefällte DNA abzentrifugiert. Die DNA wurde einmal mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und nach dem Trocknen bei RT in 100 μ l TE-Puffer (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM) resuspendiert.

Beispiel 3

Polymerase-Ketten-Reaktion

5 Die PCR dient der gezielten in vitro Vermehrung ausgesuchter DNA-Bereiche.

Für die Reaktionen wurde vorzugsweise Vent-DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Schwalbach) eingesetzt. Durchgeführt wurde die Reaktion in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen).

Die Amplifikation eines DNA-Abschnittes mittels der PCR-Technik (Polymerase Chain Reaction, Salki et al., 1985) wurde in einem 100 µl Standardansatz durchgeführt (Tab. 1).

10

Tabelle 1

Zusammensetzung der PCR-Ansätze

	<i>gmd</i>	<i>wcaG</i>	<i>manB</i>	<i>manC</i>	<i>rfbD</i>	<i>rfbE</i>
Polymerase-Puffer (10x)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
dNTP-Mix (1,2 mM)	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl
Primer ^a (Gen-Start)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer ^a (Gen-Ende)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
DMSO	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Magnesiumsulfat (100 mM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Vent-Polymerase	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
chromosomale DNA	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Wasser	59 µl	59 µl	59 µl	59 µl	59 µl	59 µl

* Die Primer wurden, bevor sie in die PCR eingesetzt wurden, 1:10 verdünnt. Die Konzentration entsprach im PCR-Ansatz = 50 pmol/100 µl. OD260 = 1,0/100 µl ≈ 100 pmol. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug jeweils 100 µl und wurde mit 60 µl sterilem Mineralöl überschichtet.

40 Die PCR-Ansätze zur Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche wurden den tabellarisch aufgeführten Temperaturprogrammen (Tab. 2) unterzogen.

Tabelle 2

Zusammenfassung der PCR-Programm-Daten

	<i>gmd</i>		<i>wcaG</i>		<i>manB</i>		<i>manC</i>		<i>rfbE</i>		<i>rfbD</i>	
	Zeit	T ^a	Zeit	T ^a	Zeit	T ^a	Zeit	T ^a	Zeit	T ^a	Zeit	T ^a
	[sec]	[°C]	[sec]	[°C]	[sec]	[°C]	[sec]	[°C]	[sec]	[°C]	[sec]	[°C]
1.Schritt: Hot start	300	98	300	98	300	98	300	98	300	98	300	98
2.Schritt ^b : Denaturierung	60	95	60	95	60	95	60	95	60	95	60	95
3.Schritt: Annealing	45	50	45	45	50	57	50	62	45	48	45	45
4.Schritt: DNA-Synthese	60	72	60	72	70	72	70	72	60	72	60	72
5.Schritt: Denaturierung	60	95	60	95	60	95	60	95	60	95	60	95
6.Schritt: Annealing	45	60	45	56	50	61	50	71	45	57	45	56
7.Schritt: DNA-Synthese	60	72	60	72	70	72	70	72	60	72	60	72
8.Schritt	Pause	12	Pause	12	Pause	12	Pause	12	Pause	12	Pause	12

*Die Temperaturänderung (ramping rate) zwischen den einzelnen Schritten betrug 2 °C/s

^bDie Zugabe der Polymerase erfolgte nach einem "hot start" während des ersten 95°C Schrittes

Der PCR-Programmverlauf wurde so gewählt das die Schritte 2–4 in einem Durchlauf 6 mal, und die Schritte 5–7 30

mal wiederholt wurden.

Tabelle 3

Verwendete PCR-Primer

5

Name	Gen/Anmerkungen	Sequenz ^a
PMANB1	<i>manB</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5' GCCTGAAAAAGGGTAACC <u>ATGGAA</u> AAA 3'
PMANB2	<i>manB</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle	5' GGGTAAGGG <u>GAGGATCC</u> GACATTAC 3'
PMANC1	<i>manC</i> , <i>NcoI</i> -Schnittstelle	5' TTCGGGGATAACC <u>ATGGCG</u> CAGTCG 3'
PMANC2	<i>manC</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle	5' ACACCG <u>CGGATCC</u> CATTGCC 3'
CAMD1	<i>gmd</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5' ACAGAGGAATAAC <u>ATATGTCAAAAGTCGC</u> 3'
CAMD2	<i>gmd</i> , <i>BglII</i> -Schnittstelle	5' CCAGCAATAAA <u>AGATCTTGTTACTCATGC</u> 3'
CAMD3	<i>wcaG</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5' ATCGCGCTGGAGTC <u>CATACATAGAGTAAAC</u> 3'
CAMD4	<i>wcaG</i> , <i>BglII</i> -Schnittstelle	5' ACGTAAA <u>AGATCTTACCCCCGAAA</u> 3'
CAVC1	<i>rfbD</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'-GGATATT <u>TACATATGAATAAAAAAGTTG</u> -3'
CAVC2	<i>rfbD</i> , <i>BglII</i> -Schnittstelle	5'-CAGGAAT <u>CATTAAAGATCTCACTCTAC</u> -3'
CAVC3	<i>rfbE</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'-GTGAGGT <u>CCTTCATATGATT CCTGTAT</u> -3'
CAVC4	<i>rfbE</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle	5'-GGAGGT <u>AAGGGATCCC</u> AACTACTA-3'

^a Neu gebildete Schnittstellen sind in der Tabelle angegeben und in der Nucleotidsequenz unterstrichen.

Beispiel 4

45

Klonierung der Leserahmen von *manB*, *manC*, *gmd*, *rfbD*, *rfbE* und *wcaG* in Expressionsvektoren

Für die Überexpression von ManB, ManC, Gmd, RfbD, RfbE und WcaG in E. coli wurden die durch PCR isolierten Leserahmen in Expressionsvektoren kloniert. In diesem Fall wurden hierfür vorzugsweise die Expressionsvektoren pET11a und pET16b der Firma Novagen (Studier, F. W., et al., Methods Enzymol. 189, 113–130, 1990) ausgewählt. Bei diesen Vektoren handelt es sich um starke Klonierungs- und Expressionssysteme für rekombinante Proteine in E. coli.

50

Für die Klonierung in die Vektoren wurde diese mit Hilfe der Hydrolyse durch die Restriktionsendonukleasen *NdeI* bzw. *NcoI* und *BamHI* linearisiert. Die mit *NdeI* bzw. *NcoI* und *BglII* bzw. *BamHI* hydrolysierten Fragmente der PCR-Produkte von *manB*, *manC*, *gmd* und *wcaG* wurden in die zuvor *NdeI* bzw. *NcoI* und *BamHI* hydrolysierten Expressionsvektoren ligiert (pCAW13.1 (*qbd*); pCAW14.1 (*qbE*); pCAW19.1 (*manB*); pCAW20.1 (*manC*); pCAW21.1 (*gmd*); pCAW22.1 (*wcaG*); pCAW21.2 (*his-gmd*); pCAW22.2 (*his-wcaG*), siehe Fig. 2–9) und in E. coli transformiert. Durch die Klonierung in die *NdeI* bzw. die *NcoI*-Schnittstelle der pET-Vektoren wurde sichergestellt, daß das Startcodon erhalten bleibt und im optimalen Abstand zur Shine-Dalgarno Sequenz auf dem Vektor liegt.

55

Der Vektor pET16b ermöglicht durch seine leader Sequenz (*his*) eine Fusion von 12 Histidinresten an den N-Terminus des überexprimierten Proteins, welche eine Voraussetzung für eine Aufreinigung des Proteins über eine Ni-Agarose-Säule waren. Die auf diese Weise entstandenen rekombinanten Proteine werden im Folgenden als His-Gmd bzw. als His-WcaG und die für diese codierenden Gene als his-gmd bzw. als his-wcaG bezeichnet.

60

Ligation: Die zu liganerden Fragmente und Vektoren wurden durch Elutionen (Beispiel 1) aus Agarosegelen aufgereinigt. Bei Ligationen von DNA-Fragmenten mit überstehenden Enden ("sticky end") wurde das zu liganerende Fragment im vierfachen Überschuß zum geschittenen Vektor eingesetzt und bei RT mit 1 U T4-DNA-Ligase für 4 h inkubiert.

65

Transformation bei E. coli Zellen: Die kompetenten Zellen (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557–580, 1983) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2–20 µl DNA-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 min auf Eis wur-

den die Zellen für 90 s auf 42°C (Hitzeschock) und danach mindestens 2 min auf Eis gestellt. Zur Regenerierung wurde zu den Zellen 800 µl SOC-Medium (2,0% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM D-Glucose) zupipetiert und 45 min bei 37°C inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 100–1000 µl auf Selektionsagarplatten ausplattiert und UN bei 37°C gelagert.

5

Beispiel 5

DNA-Sequenzierung

- 10 Die DNA-Sequenzierung, der isolierten Leserahmen, erfolgte mit rekombinanten pET11a-Plasmiden nach der Methode von Sanger et al. (Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467, 1977). Für die automatisierte Sequenzanalyse mit dem A.L.F. Express Sequenzierer (Pharmacia, Freiburg) wurde die Sequenzreaktion mit Fluorescein markierten "termi"- und "promo"-Primern und dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Amersham, Braunschweig) durchgeführt.

termi-Primer 5'GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG 3'
promo-Primer 5'GAAATAAAATACGACTCACTATAGGG 3'.

20

Beispiel 6

Überexpression von ManB, ManC, Gmd, RfbD, RfbE, WcaG, His-Gmd und His-WcaG

- 25 Die Genprodukte lassen sich vorzugsweise mit Hilfe eines T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems in E. coli BL21 (DE3) überexprimieren (Studier et al., 1990). Dazu wurde hinter dem φ10 Promotor das entsprechende Gen in die MCS der Vektoren pET16b bzw. pET11a kloniert (s. Beispiel 4), die eine geeignete SD-Sequenz im optimalen Abstand zum Startcodon des Zielgens besitzen. Die entstandenen rekombinanten Plasmide wurden durch Transformation in kompetente Zellen des E. coli Stammes BL21 (DE3) eingebracht.

Überexpression in E. coli BL21 (DE3) pLysS: Von einer ÜN-Kultur des Stammes mit entsprechendem Plasmid wurde 30 LB-Medium (mit Ampicillin, Chloramphenicol) auf eine OD_{540nm} von 0,05 angeimpft und im Schütteler bei 37°C bis zu einer OD_{540nm} von 0,6–0,8 inkubiert. Durch Zugabe von 1,0 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) wurde die T7-RNA-Polymerase induziert. 90 min nach Zugabe von IPTG wurden die Zellen geerntet.

Für Proteineextrakte aus E. coli Überexpressionsklonen wurden die Zellen durch Abzentrifugieren geerntet und zweimal mit Zellaufschlußpuffer gewaschen. Zum Resuspendieren wurden 1,5 ml Zellaufschlußpuffer auf 1,0 g Zellen gegeben. Zum Aufschließen der Zellen wurden zwei Methoden alternativ verwendet, wobei sich die Wahl danach richtete, wieviel Puffer zum Resuspendieren nötig war. Bei einem Volumen von weniger als 5 ml wurden die Zellen mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen, wobei die Zellen 5 min mit Ultraschall (50 Zyklen, 15 s Pulsen und 15 s Pause) beschallt und gleichzeitig mit einer Eis/Wasser-Mischung gekühlt wurden. Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Aufschlusses wurde der Extrakt unter dem Mikroskop überprüft.

40 Wenn die Zellen in einem Volumen von mehr als 5 ml Aufschlußpuffer resuspendiert wurden, konnten sie zweimal mit 1300 psi durch eine French-Press (American Instrument Company, Maryland, USA) aufgeschlossen werden.

Die Suspensionen mit den aufgeschlossenen Zellen wurden im SS-34 Rotor (Sorvall, DuPont, Bad Nauheim) zwischen 3045 min bei 16000 rpm zentrifugiert, wobei Zellbruchstücke sedimentieren.

45

Tabelle 4

Daten der Gene und der erwarteten Genprodukte

Gen bzw. Genprodukt	Größe des PCR- Produktes	Größe des Gens	Berechnete Proteingröße	Proteingröße im SDS-PAGE
<i>manB/ManB</i>	1412 bp	1371 bp	50430 Da	≈ 50 kDa
<i>manC/ManC</i>	1486 bp	1437 bp	52996 Da	≈ 53 kDa
<i>gmd/Gmd</i>	1025 bp	1122 bp	42020 Da	≈ 42 kDa
<i>gmd/His-Gmd</i>			44620 Da	≈ 45 kDa
<i>rfbD/RfbD</i>	1154 bp	1122 bp	42026 Da	≈ 42 kDa
<i>rfbE/RfbE</i>	1277 bp	1104 bp	40984 Da	≈ 40 kDa
<i>wcaG/WcaG</i>	1154 bp	966 bp	36090 Da	≈ 35 kDa
<i>wcaG/His-WcaG</i>			38690 Da	≈ 37 kDa

DE 197 35 994 A 1

Beispiel 7

Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Die Anreicherung von rekombinanten Proteinen lässt sich vorzugsweise durch eine C- oder N-terminal Fusion, mit Histidin haltigen Oligopeptiden ermöglichen (Beispiel 4). Mit Hilfe der Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (Haan) und in Anlehnung an das QIAexpress-Protokoll wurde die Anreicherung durchgeführt. Diese Affinitätschromatographie beruht auf der Bindung der Nickel-Ionen der Ni-NTA-Agarose mit dem His-Tag des speziell konstruierten, rekombinanten Proteins (His-Gmd, His-WcaG). Für die Aufreinigung wurde eine HPLC-Anlage, die aus Liquid Chromatography Controller (LCC-500 Plus, Firma Pharmacia), zwei Kolbenpumpen (P500, Firma Pharmacia), einem Durchfluss UV-Monitor (UV-1, $\lambda_{280\text{nm}}$, Firma Pharmacia), einem 2-Kanal-Schreiber (Rec 482, Firma Pharmacia) und einem Fraktionssammler (Frac 100, Firma Pharmacia) bestand benutzt.

5

10

15

Beispiel 8

Gelelektrophoretische Darstellung von Proteinen

Denaturierende Trennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen und deren Färbung mit Coomassie-Farbstoff

Tabelle 5

20

Zusammensetzung eines Acrylamid/Bisacrylamid-Proteingels

25

30

35

	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (6%)
Wasser	6,6 ml	5,3 ml
Sammelpuffer (1,25M Tris/HCl pH 8,8)	-	2,5 ml
Trennpuffer (1,5M Tris/HCl pH 6,8)	5,0 ml	-
10% (w/v) SDS	210 µl	105 µl
Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg. (29:1)	8,0 ml	2 ml
Ammoniumpersulfat (50mg/ml)	210 µl	100 µl
Tetramethylenthylendiamin	8 µl	8 µl

Die Elektrophorese erfolgte mit der SERVA Blue-Vertical 100/C Apparatur (BioRad, München) (Gelform, 80 × 100 × 0,75 mm). Die Bestimmung der Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben erfolgte mit dem Protein-Assay (BioRad, München), wobei mit BSA eine Eichgerade erstellt wurde. Als Standard für die Molekulargewichte der getrennten Proteine diente der "VIII. Dalton-Marker (14,2 kDa–66 kDa) von Sigma (Deisenhofen).

40

45

Beispiel 9

Bestimmung von Enzym-Aktivitäten

Bestimmung der Phosphomannomutase-Aktivität

Die Bestimmung der Phosphomannomutase-Aktivität erfolgte nach (Verseck, S., Ritter, E., Elling, L., Glycobiology 6, 591–597, 1996).

50

60

65

Enzymansatz

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM	55
MgCl ₂	10 mM	
NADP ⁺	1 mM	
Glucose-1,6-bisphosphat	0,25 mM	
Mannose-1-phosphat	1 mM	
Rohextr. ManB	variabel	60
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0,5 U/ml	
Phosphomannose-Isomerase	0,5 U/ml	
Phosphoglucose-Isomerase	0,5 U/ml	
Endvolumen	500 µl	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mannose-1-phosphat gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde, bei 30°C, durch die Extinktion bei $\lambda_{340\text{nm}}$ spektroskopisch verfolgt.

DE 197 35 994 A 1

Bestimmung der GDP-D-Mannosepyrophosphorylase-Aktivität

Die Bestimmung der GDP-D-Mannosepyrophosphorylase-Aktivität erfolgte mit dem PP_i-Reagenz von Sigma (Deisenhofen).

5

Enzymansatz

PP _i -Reagenz	170 µl
Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
10 MgCl ₂	10 mM
GTP	2 mM
Mannose-1-phosphat	10 mM
Rohextr. ManC	variabel
Endvolumen	500 µl

15

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mannose-1-phosphat gestartet. Die Abnahme, bei 37°C, von NADH wurde spektroskopisch bei $\lambda_{340\text{nm}}$ verfolgt. Der molare Extinktionkoeffizient für NADH₂ betrug $\epsilon_{340} = 6,22 \times 10^6 \text{ l/(mol} \times \text{cm)}$.

20

Bestimmung der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase-Aktivität

Die Bestimmung der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase-Aktivität erfolgte nach (Kornfeld et al. 1965).

Enzymansatz

25 Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
GDP-D-Mannose	4 mM
Rohextr. Gmd bzw. RfbD	variabel
Endvolumen	300 ml

30

Es wurden zu definierten Zeiten 50 µl Probe entnommen, zu 950 µl 1 N NaOH gegeben und weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei $\lambda_{320\text{nm}} (\epsilon_{320} \approx 4600 \text{ l/(mol} \times \text{cm)})$. In der negativ-Kontrolle wurde GDP-D-Mannose durch Wasser ersetzt.

35

Bestimmungen der GDP-4-Keto-6-desoxymannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase Aktivität

Enzymansatz

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
GDP4-Keto-6-desoxymannose	2 mM
40 NADPH ₂	1 mM
Rohextr.WcaG	variabel
Endvolumen	0,5 ml

45

Die Reaktionen wurden durch die Zugabe des zu testenden Rohextraktes gestartet. Gemessen wurde die Abnahme von NADPH₂ bei $\lambda_{340\text{nm}} (\epsilon_{340} = 6,22 \times 10^6 \text{ l/mol} \times \text{cm})$, bei einer Temperatur von 37°C.

Bestimmungen der GDP-D-Perosamin-Synthase Aktivität

Enzymansatz

50 Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
GDP-4-Keto-6-desoxymannose	2 mM
L-Glutamat	2,5 mM
Pyridoxalphosphat	8 mM
55 Magnesiumchlorid	1 mM
Rohextr.RfbE	variabel
Endvolumen	0,5 ml

60

Als Aminodonor wurde die Aminosäure L-Glutamat verwendet.

Der Enzymansatz wurde bei 37°C inkubiert, und die Reaktion durch Erhitzen auf 100°C im Wasserbad für 1 min gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren des Proteines wurde die Lösung einer HPLC-Analyse unterzogen.

Mit RfbD, RfbE, ManB, ManC, WcaG und Gmd sind die jeweiligen Überexpressionsklone bezeichnet (s. Beispiel 6).

65

DE 197 35 994 A 1

Beispiel 10

Ansatz zur Präparative Umsetzung von D-Mannose-6-phosphat zu GDP-D-Mannose

Ansatz zur Präparative Umsetzung mit ManB und ManC

5

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM	
Mannose-6-phosphat	150 µmol	
MgCl ₂	10 mM	
Rohextr. ManB	120 nat	10
Rohextr. ManC	120 nat	
GTP	150 µmol	
Endvolumen	6 ml	

Es wurde Rohextrakt von E. coli BL21(DE3) /pLysS pCAW19.1 oder pCAW20.1 für die Umsetzung zu GDP-D-Mannose eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen von 1 min abgestoppt. Die Proteine wurden durch Ultrafiltration in Mikrosep-Röhrchen (Ausschlußgröße 3 kDa; Amicon, Heidelberg) bei 8000 rpm (SS-34 Rotor; Sorvall DuPont, Bad Nauheim) über Nacht abgetrennt.

Beispiel 11

15

Präparative Umsetzung von GDP-D-Mannose zu GDP4-Keto-6-desoxymannose

Ansatz zur Präparative Umsetzung mit Gmd bzw. RfbD

25

Tris/HCl, pH 7,5	300 µmol	
GDP-D-Mannose	165 µmol (100 mg)	
Rohextr.Gmd bzw. RfbD	120 nkat	
Endvolumen	6 ml	

Es wurde Rohextrakt von E. coli BL21(DE3) /pLysS pCAW21.1 bzw. 2 oder pCAW13.1 für die Umsetzung von GDP-D-Mannose eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen von 1 min abgestoppt. Die Proteine wurden durch Ultrafiltration in Mikrosep-Röhrchen (Ausschlußgröße 3 kDa; Amicon, Heidelberg) bei 8000 (SS-34 Rotor; Sorvall DuPont, Bad Nauheim) über Nacht abgetrennt. Der Überstand wurde für die präparative Synthese von weiteren GDP-Hexosen wie GDP-L-Fucose oder GDP-D-Perosamin weiter verwendet.

30

35

Beispiel 12

40

Präparative Umsetzung von GDP4-Keto-6-desoxymannose zu GDP-L-Fucose

Ansatz zur Präparative Umsetzung mit WcaG

45

Tris/HCl, pH 7,5	400 µmol	
dTDP4-Keto-6-desoxymannose	82 µmol (50 mg)	
NADPH ₂	123 µmol	
Rohextrakt WcaG	3,5 U	
Endvolumen	8 ml	

Zur Regenerierung von oxidiertem Nicotinamid-adenindinukleotid-phosphat (NADP⁺) bzw. Nicotinamid-adenindinukleotid (NAD⁺) wird dieses z. B. durch die enzymatische Reaktion mit Isocitrat unter Katalyse von Isocitrat-Dehydrogenase wieder reduziert.

50

Die GDP4-Keto-6-desoxymannose stammt aus dem in Beispiel beschriebenen Ansatz. Es wurde für die Umsetzungen Rohextrakte von E. coli BL21(DE3) /pLysS pCAW22.1 (WcaG). Diese Ansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann auf Eis gekühlt und 150 µl 0,3 M Perchlorsäure dazugegeben. Die so gefällten Proteine wurden bei 30000g für 1 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 1 M Kaliumhydroxid neutralisiert.

55

Beispiel 13

60

Präparative Umsetzung von GDP4-Keto-6-desoxymannose zu GDP-D-Perosamin

Ansatz zur Präparative Umsetzung mit RfbE

65

Tris/HCl, pH 7,5	400 µmol	
dTDP4-Keto-6-desoxymannose	82 µmol (50 mg)	
L-Glutamat	123 µmol	
Rohextrakt RfbE	3,5 U	
Pyridoxal-phosphat	100 µmol	
Endvolumen	8 ml	

Die GDP-4-Keto-6-desoxymannose stammt aus dem in Beispiel 11 beschriebenen Ansatz. Es wurde für die Umsetzungen Rohextrakte von *E. coli* BL21(DE3) /pLysS pCAW14.1 (RfbE). Diese Ansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann auf Eis gekühlt und 150 µl 0,3 M Perchlorsäure dazugegeben. Die so gefällten Proteine wurden bei 30000 g für 1 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 1 M Kaliumhydroxid neutralisiert.

5

Beispiel 14

Neben den in den Beispielen 10–13 beschriebenen Enzymreaktionen im Batch-Verfahren wird die Reaktion des weiteren mit immobilisierten Enzymen erreicht welche von der Substrat- und Pufferlösung, vorzugsweise bei einer Temperatur von 30–37°C, umspült wird. Eine Immobilisierung der Enzyme wird z. B. durch die Bindung der His-Taq-Fusionsproteine (His-Gmd, His-WcaG) an eine Ni-NTA-Agarose Säule (Qiagen, Hilden) oder durch die Verwendung eines Membranreaktors erreicht.

10 15 Beispiel 15

Aufreinigung von GDP-Hexosen

DOWEX-Ionen-Austauschchromatographie

Um das Nebenprodukt NADP⁺ bzw. NAD⁺ und das Restsubstrat NADPH₂ bzw. NADH₂ bei der Synthese von GDP-L-Fucose bzw. um Pyridoxal-phosphat, L-Glutamat und α-Ketogutarat bei der Synthese von GDP-D-Perosamin abzutrennen wurde eine Anionen-Austauschchromatographie mittels eines 1 × 8 DOWEX-Harzes ("mesh" = 200–400; Serva, Heidelberg) mit Formiat als Gegenion gewählt. Das Harz wurde in eine SR 25/50-Säule (Pharmacia, Freiburg) gefüllt. Die Gelbett Höhe betrug 12,5 cm und das Gesamtvolumen 61 ml. Für die Trennung wurde eine FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg) mit einem UV-Monitor Filter für $\lambda_{254\text{nm}}$ benutzt. Die Elution erfolgte wie folgt:

Elutionsvolumen (ml):	Dowex-Puffer A (%)
1200	50
1400	100

Das Gesamtvolumen betrug 1400 ml und die Flußrate 6 ml/min. Es wurden Fraktionen zu 15 ml aufgefangen. Die Elution erfolgte bei 5°C. Es folgte eine HPLC-Analyse der Fraktionen, wonach die Fraktionen vereinigt wurden, die die GDP-aktivierte Hexose enthielten. Anschließend wurde diese Lösung im Hochvakuum (Drehschieber-Vakuumpumpe RD4, Vakuubrand GmbH+Co, Wertheim) unter Röhren bei ca. 25°C auf 10–20 ml eingeengt.

Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 185 ml 4 M Anisesensäure regeneriert und solange mit H₂O gespült, bis ein neutraler pH gemessen wurde.

Gelfiltration

Zum Entsalzen der nach der Ionenaustauscherchromatographie erhaltenen Fraktion wurde eine Sephadex G-10-Säule (SR 25/100-Säule; Pharmacia, Freiburg) benutzt. Die Gelbett Höhe betrug 81 cm und das Gesamtvolumen 398 ml. Die Detektion der GDP-aktivierten Hexose erfolgte über einen UV-Monitor (Uvicord SII, $\lambda_{254\text{nm}}$, Pharmacia, Freiburg) und einem 2-Kanal-Schreiber (Rec 482, Pharmacia, Freiburg). Die Proben wurden mit einem Fraktionssammler (Frac 100, Pharmacia, Freiburg) aufgefangen. Die eingeengte Fraktion der Anionen-Austauschchromatographie wurde mit einer Peristaltikpumpe (Pump P-1; Pharmacia, Freiburg) und einer Flußrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit H₂O zuerst mit einer Flußrate von 0,5 ml/min für 20–30 ml, danach mit 1 ml/min. Es folgte eine HPLC-Analyse der Fraktionen, wonach die Fraktionen vereinigt wurden, die die GDP-aktivierte Hexose enthielten.

Umsalzung mit einem Anionenaustauschmembran

Um die Reste des Ammoniumformiats gegen NaCl auszutauschen wurde die Fraktion der Gelfiltration mit 10 ml/min auf das Membran-Anionenaustauschmodul Q15 (Sartorius, Göttingen) gepumpt (Pump P-1; Pharmacia, Freiburg). Danach wurde das Anionenaustauschmodul mit 20–50 ml H₂O gespült und anschließend die aktivierte Hexose mit 150 mM NaCl von der Membran eluiert. Die Flußrate betrug immer 10 ml/min. Anschließend wurde diese Lösung im Hochvakuum (Drehschieber-Vakuumpumpe RD4, Vakuubrand GmbH+Co, Wertheim) unter Röhren bei ca. 25°C auf 10–20 ml eingeengt. Nach jedem Lauf wurde die Membran mit 20–30 ml 0,2 M NaOH regeneriert und solange mit H₂O gespült, bis ein neutraler pH gemessen wurde.

Gelfiltration und Gefriertrocknung

Das Entsalzen der nach der Umsalzung erhaltenen Lösung wurde mit einer Sephadex G-10-Säule wie oben beschrieben durchgeführt.

Nach dem Entsalzen wurde der Pool der GDP-aktivierten Hexose in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei RT gefriergetrocknet Cryograph LCD-1, Christ GmbH, Osterode am Harz und Drehschieber-Vakuumpumpe RD4, Vakuubrand GmbH+Co, Wertheim).

Beispiel 16

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Zur Reaktionskontrolle und zur Analyse der Nukleotid-aktivierter Zucker wurde vorzugsweise die Hochdruckflüssig-chromatographie eingesetzt. Die HPLC-Trennungen wurden durchgeführt mit einem Gerät der Firma Beckmann (Beckmann Instruments, München), bestehend aus UV-Detektor 166, Pumpmodul 125 und Autosampler 502. Folgendes Trennsystem (Payne, S.M., Ames, B.N., Anal. Biochem. 123, 151–161, 1982) wurden verwendet:

"reversed" phase-Chromatographie

Säule: Eurospher 100 C18; Korngröße 5 mm; 250 × 4,6 mm (Knauer, Berlin)

5

10

Laufmittel A:

Kaliumphosphatpuffer, pH 6: 30 mM

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat: 5 mM

Acetonitril: 2%

15

Laufmittel B:

Acetonitril: 100%

Elutionsprogramm:

Flußrate: 1,5 ml/min

von 0% bis 40% Laufmittel B: 60 min

20

100% Laufmittel A: 15 min

Alle Laufmittel wurden vor der Benutzung in einer Sterilfilter-Einheit mit einer MF12-Membran (Durchmesser: 0,2 µm; Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert und entgast. In allen Chromatographien besaß die Probenschleife ein Volumen von 20 µl. Die Detektion fand bei 260 nm statt. Die Auswertung der Elutionsprofile erfolgte mit dem Computerprogramm Gold Version 7.11U (Beckmann Instruments, München). Die Identifizierung der Nukleotidaktivierten Zucker erfolgte durch Cochromatographic, sowie durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen. Für die Quantifizierung der Zucker wurde mit Standardsubstanzen eine Dreipunkteichung der Peakflächen in Abhängigkeit von der Konzentration vorgenommen.

25

30

Tabelle 6

Retentionszeiten der UV-aktiven Substanzen

Probe	Retentionszeiten
GDP-D-Mannose	15,1 min
GDP-D-4-keto-6-desoxy-Mannose	21,6 min
GDP-beta-L-Fucose	19,2 min
GDP-D-Perosamin	5,5 min
GDP	22,7 min
GMP	9,7 min
NADP+	25,6 min
NADPH ₂	39,6 min
Pyridoxal-phosphat	47,9 min

35

40

45

50

55

Beispiel 17

NMR-Spektroskopie

Die Identifizierung der GDP-aktivierten Zucker erfolgte durch NMR-Spektroskopie. Die Aufnahmen der ¹H-, ¹³C- und ³¹P-Spektren erfolgte all einem 400 MHz-Gerät (Bruker AC 400, Fa. Bruker-Franzen Analytik, Bremen). Die zu messenden Proben wurden in D₂O gelöst. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Als Referenz standen für GDP-β-L-Fucose die H-NMR Daten von Bis(triethylammonium)-β-L-Fucopyranosyl Guanosin 5'-Pyrophosphat aus chemischen Synthese zur Verfügung (Schmidt, R., Wegmann, B., Jung, K., Liebigs Ann. Chem., 121–124, 1991).

60

65

Beispiel 18

In vivo-Produktion von GDP-Hexosen bzw. von Fucosylierten oder Perosaminylierten Oligosacchariden

- 5 Klonierte Gene (siehe Beispiel 4) werden in Vektoren unter Kontrolle konstitutiver oder induzierbarer Promotoren in einer gemeinsamen Transskriptionseinheit kloniert und in Mikroorganismen, bevorzugt *E. coli*, *Streptomyces* sp. oder *Saccharomyces cerevisiae* transformiert. Alternativ werden dazu auch die natürlichen Gene mit ihren eigenen Promotoren verwendet. Die aktivierte Zucker werden intrazellulär mit Hilfe geeigneter Glycosyltransferasen z. B. *WcbH* (Galactoside-2-L-Fucosyltransferase) aus *Yersinia enterocolitica* auf geeignete Substrate z. B. β -Galactoside übertragen, die 10 entweder biosynthetisch in der Wirtszelle hergestellt oder von außen gefüttert werden.

Patentansprüche

- 15 1. Verfahren nach Beispielen 3 und 4 zur Isolierung und Klonierung der Gene *manB* (kodiert Phosphomannomutase), *manC* (kodiert GDP-D-Mannose Synthase), *gmd* (kodiert GDP-D-Mannose 4,6-Dehydratase), *rfbD* (kodiert GDP-D-Mannose 4,6-Dehydratase), *wcaG* (kodiert GDP4-Keto-6-desoxymannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase), *rftT* (kodiert Fucosyltransferase) aus *Escherichia coli*, *wbcH* (kodiert Fucosyltransferase) aus *Yersinia enterocolitica*, *fucT* (kodiert Fucosyltransferase) aus *Helicobacter pylori*, Perosaminyltransferasen aus *Vibrio cholerae* O1 u. a. Bakterien in geeigneten Klonievektoren und Transformation in geeignete bakterielle (z. B. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces lividans*) und pilzliche (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polyniorpha* *Pichia stipidis*) Empfängerstämme biotechnisch nutzbarer Mikroorganismen.
- 20 2. Verfahren nach Beispiel 6 und 7 zur aktiven Expression der Gene *manB* (kodiert Phosphomannomutase), *manC* (kodiert GDP-D-Mannose Synthase), *gmd* (kodiert GDP-D-Mannose 4,6-Dehydratase), *rfbD* (kodiert GDP-D-Mannose 4,6-Dehydratase), *wcaG* (kodiert GDP4-Keto-6-desoxymannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase), *rftT* (kodiert Fucosyltransferase) aus *Escherichia coli*, *wbcH* (kodiert Fucosyltransferase) aus *Yersinia enterocolitica*, *fucT* (kodiert Fucosyltransferase) aus *Helicobacter pylori*, Perosaminyltransferasen aus *Vibrio cholerae* O1 u. a. Bakterien und Anreicherung der kodierten Enzyme. Das Verfahren ist gekennzeichnet durch die Verwendung geeigneter Promotoren und Ribosomenbindestellen (falls notwendig) nach den Beispielen 6, um in der Konstruktionskassette eine Produktion einer möglichst hohen Proteinkonzentration und als lösliches, aktives Enzym zu erzielen. Die Enzymproteine werden mit klassischen Methoden der Enzympräparation oder alternativ als Histag-Fusionsproteine nach den Beispielen 6 in hochangereicherter Form präpariert und in stabiler Form konserviert.
- 25 3. Verfahren unter Verwendung der Enzyme (*ManB*, *ManC*) nach Anspruch 2 zur enzymatischen in vitro Produktion von GDP-D-Mannose im präparativen Ansatz basierend auf Beispiele 10. Das Verfahren ist gekennzeichnet das als Substrate für die Synthese Mannose-6-Phosphat und Guanosintriphospat verwendet wird.
- 30 4. Verfahren unter Verwendung der Enzyme (*RfbD* oder *Gmd*) nach Anspruch 2 zur enzymatischen in vitro Produktion von GDP4-Keto-6-desoxy-D-mannose nach dem Beispiel 11. Das Verfahren ist gekennzeichnet das als Substrate für die Synthese GDP-D-Mannose verwendet wird bzw. ausgehend von Mannose-6-Phosphat und Guanosintriphospat die RfbD/Gmd-Reaktion mit der Enzymreaktion nach Anspruch 3 gekoppelt wird.
- 35 5. Verfahren unter Verwendung des Enzyms (*WcaG*) nach Anspruch 2 zur enzymatischen in vitro Produktion von GDP-L-Fucose und nach dem Beispiel 12. Das Verfahren ist gekennzeichnet das als Substrate für die Synthese GDP4-Keto-6-desoxy-D-mannose, Nicotinamid-adenindinukleotid-phosphat bzw. Nicotinamid-adenindinukleotid (reduziert) verwendet wird bzw. ausgehend von Mannose-6-Phosphat und Guanosintriphospat die WcaG-Reaktion mit der Enzymreaktion nach Anspruch 3 und 4 gekoppelt wird.
- 40 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat bzw. Nicotinamid-adenindinukleotid (reduziert) durch eine Enzymreaktion, wie in Beispiel 12 beschrieben, regeneriert wird.
- 45 7. Verfahren unter Verwendung des Enzyms (*RfbE*) nach Anspruch 2 zur enzymatischen in vitro Produktion von GDP-Perosamin nach dem Beispiel 13. Das Verfahren ist gekennzeichnet das als Substrate für die Synthese GDP4-Keto-6-desoxy-D-mannose und L-Glutamat, sowie als Co-Faktor Pyridoxal-phosphat verwendet wird, bzw. ausgehend von Mannose-6-Phosphat und Guanosintriphospat die RfbE-Reaktion mit der Enzymreaktion nach Anspruch 3 und 4 gekoppelt wird.
- 50 8. Verfahren nach den Ansprüchen 3–7, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren als Batch-Verfahren durchgeführt wird.
- 55 9. Verfahren nach den Ansprüchen 3–7, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in einem Enzym-Membran-Reaktor kontinuierlich durchgeführt wird.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 3–7, dadurch gekennzeichnet, daß die die Substrate enthaltene Pufferlösung über ein festes Trägermaterial kontinuierlich perkoliert wird, an welchem die Enzyme immobilisiert sind.
11. Verfahren nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die die Substrate enthaltende Pufferlösung zu einem wiederholten Kontakt mit den Enzymen mehrfach zyklisch zurückgeführt wird.
- 60 12. Verfahren zur in vivo Produktion von GDP-D-Mannose, GDP4-Keto-6-desoxy-D-mannose, GDP-L-Fucose und GDP-D-Perosamin nach dem Beispiel 18. Dazu werden die Gene unter Kontrolle eines konstitutiven oder anschaltbaren Promoters mit geringerer Expressionsleistung kloniert, z. B. *lacP*, um eine gleichbleibend optimale Synthese der Enzyme in einer Fermenterkultur oder einem Reaktor mit immobilisierten Zellen zu gewährleisten.
- 65 13. Verfahren zur Übertragung der GDP-aktivierten Zucker mittels Glycosyltransferasen, z. B. Fucosyltransferasen aus Säugetieren und Mensch, bakterielle Fucosyltransferasen aus *Escherichia coli* (*RftT*) oder *Yersinia enterocolitica* (*WbcH*), oder Perosaminyltransferase aus *Vibrio cholerae* O1, auf geeignete Akzeptorsubstanzen, z. B. beta-Galactoside. Das Verfahren ist gekennzeichnet durch die Klonierung der Glycosyltransferasegene vergleichbar mit den Beispielen 3 und 4 in geeignete Vektoren und unter Kontrolle geeigneter Promotoren nach Beispiel 18. Die re-

kombinanten Gene werden entsprechend Anspruch 2 in geeigneten Wirtsorganismen vergleichbar Beispiel 4 zur aktiven Expression gebracht und zur in vivo Glycosylierung präpariert (s. Beispiel 18). Alternativ werden die Glycosyltransferasen gemeinsam mit den GDP-Hexose Biosynthetaseenzymen (s. Anspruch 12) in denselben rekombinanten Wirtsorganismen zur Expression gebracht.

14. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene durch in vivo bzw. in vitro Mutagenese verändert werden, so daß die dadurch gebildeten Enzyme eine verändertes Substratspektrum haben bzw. in ihrem Regulationsverhalten (z. B. Endproduktinhibition) verbessert sind.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

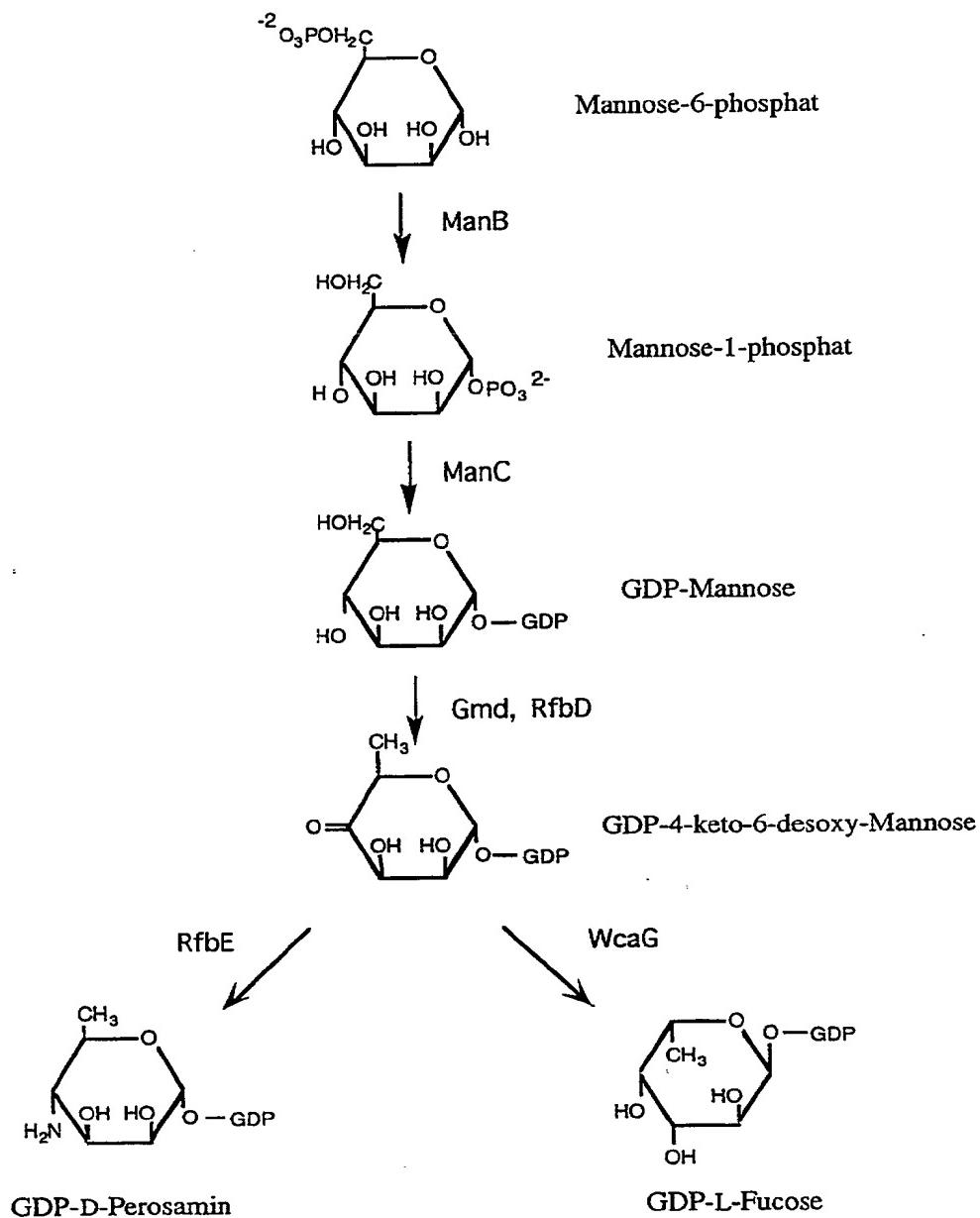
Fig.1: Enzymatische Synthese von GDP- β -L-Fucose und GDP-D-Perosamin

Fig.2: Rekombinantes Plasmid pCAW20.1

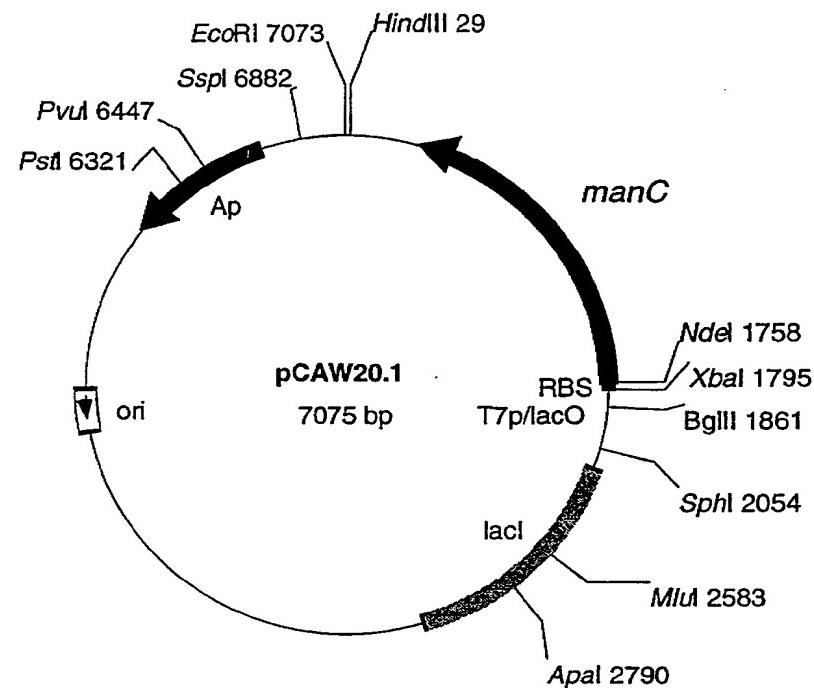


Fig.3: Rekombinantes Plasmid pCAW19.1

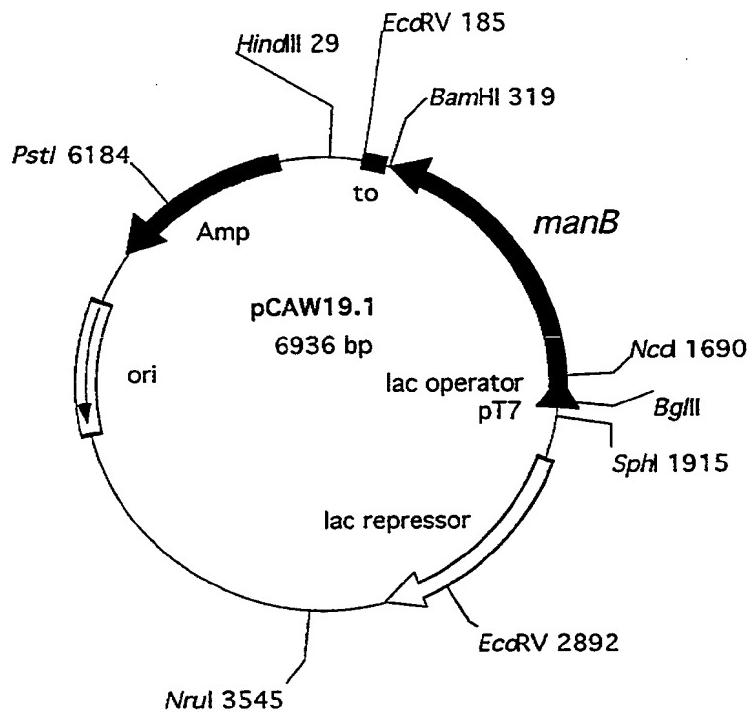


Fig.4: Rekombinantes Plasmid pCAW21.1

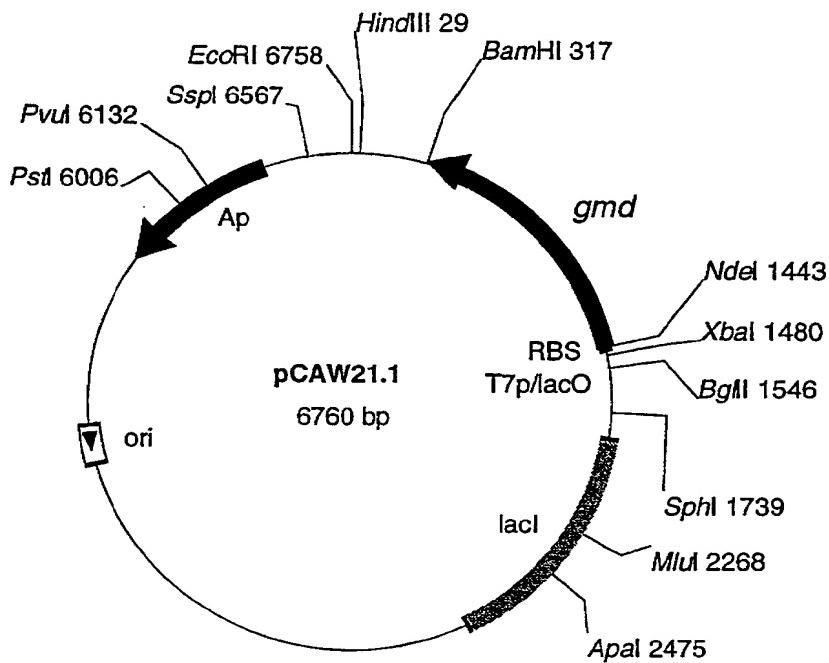


Fig.5: Rekombinantes Plasmid pCAW22.1

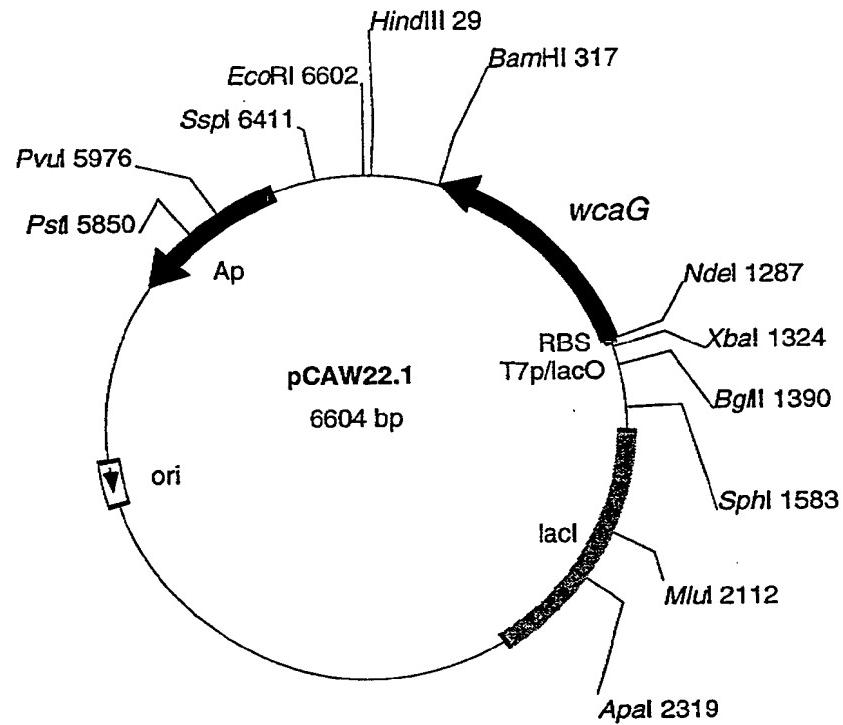


Fig.6: Rekombinantes Plasmid pCAW13.1

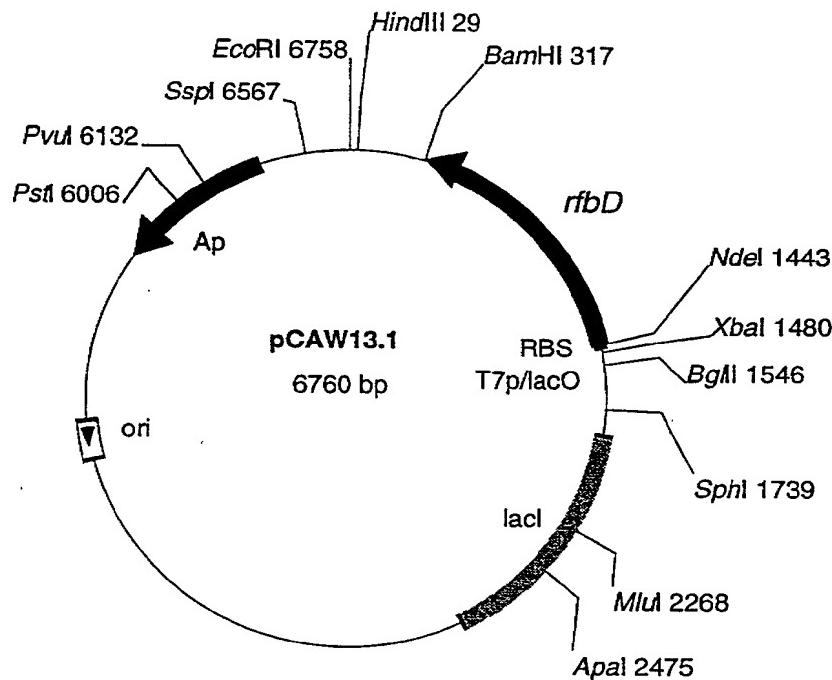


Fig.7: Rekombinantes Plasmid pCAW14.1

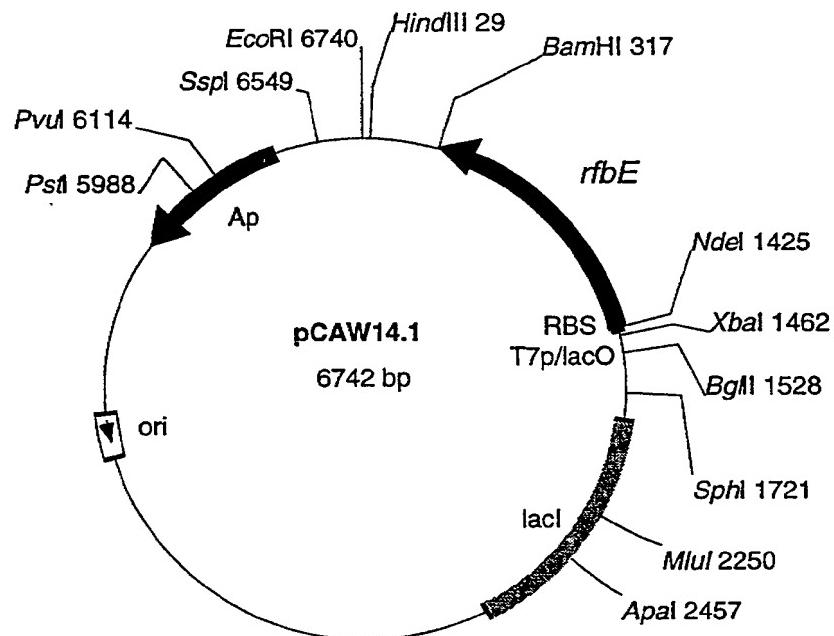


Fig.8: Rekombinantes Plasmid pCAW21.2

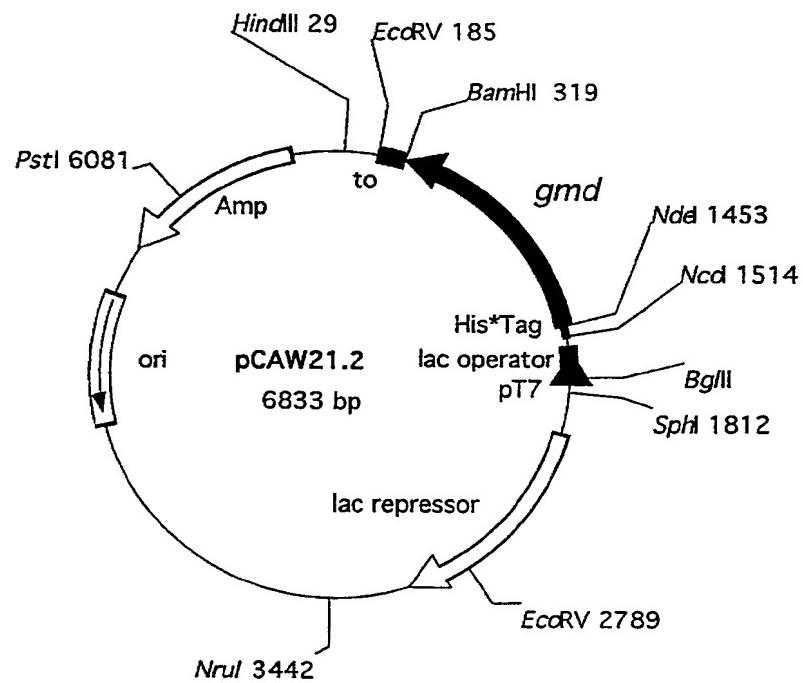


Fig.9: Rekombinantes Plasmid pCAW22.2

